

张永康,殷康力,宗媛,等. 鼠后肢缺血模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 913-921.

Zhang YK, Yin KL, Zong Y, et al. Development of a mouse model for hind limb ischemia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 913-921.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.07.010

鼠后肢缺血模型研究进展

张永康^{1,2}, 殷康力^{1,2}, 宗媛², 刘家睿^{1,2}, 王御震², 曹烨民^{2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院脉管病科, 上海 200082)

【摘要】 鼠后肢缺血模型是用于研究外周动脉疾病的经典模型。迄今已有鼠动脉结扎法、介入栓塞法、光化学栓塞法、化学损伤、物理损伤和 Ameroid 收缩器法这六大类造模方法。本文梳理了鼠后肢动脉解剖, 对后肢各个主要分支名称进行统一。介绍了鼠后肢缺血模型的造模和模型评价方法, 并比较现有方法的差异和优缺点, 指出鼠的品系、性别、年龄和麻醉方式对模型的可能影响。总之, 本文旨在为读者提供较全面的鼠后肢缺血模型的造模方法, 为研究者根据研究方向选择模型提供参考。

【关键词】 后肢缺血; 外周动脉疾病; 动物模型; 鼠类; 血栓; 血管

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 07-0913-09

Development of a mouse model for hind limb ischemia

ZHANG Yongkang^{1,2}, YIN Kangli^{1,2}, ZONG Yuan², LIU Jiarui^{1,2},
WANG Yuzhen², CAO Yemin^{2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. 2. Vascular Disease Department of Shanghai Traditional Chinese Medicine Integrated Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082)

Corresponding author: CAO Yemin. E-mail: caoyemin@shutcm.edu.cn

【Abstract】 The mouse hind limb ischemic model is a classic model used to study peripheral arterial disease. Six modeling method have been used to date: arterial ligation, interventional embolization, photochemical embolization, chemical injury, physical injury, and ameroid constrictor. This article reviews the anatomy of the murine hind limb artery and unifies the names of the major branches of the hind limb. We also introduce the modeling and evaluation method used in the mouse hind limb ischemia model, and compare the differences, advantages, and disadvantages of the existing method. Notably, mouse strain, sex, age, and method of anesthesia may affect the model. This report thus provides a comprehensive review of the modeling method of the mouse hind limb ischemia model and provides a reference for researchers to help them to select appropriate models according to their research direction.

【Keywords】 hind limb ischemia; peripheral arterial disease; animal model; murine; thrombus; blood vessel

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金 (82174382), 重大新药创制科技重大专项 (2019ZX09201004-002-091), 上海市科委科技创新行动计划 (20221900200), 上海市卫健委临床研究专项 (20224Y0387)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82174382), the National Major Scientific and Technological Special Project for Significant New Drugs Development (2019ZX09201004-002-091), the Scientific Research Project Foundation in Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (20221900200), the Clinical Research Project Foundation in Health Commission of Shanghai Municipality (20224Y0387)。

【作者简介】 张永康 (1994—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗脉管病的临床与基础研究。Email: 13761921568@163.com

【通信作者】 曹烨民 (1963—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药治疗脉管病的临床研究及临床转化, 中药治疗脉管病的药理药效研究。Email: caoyemin@shutcm.edu.cn

据统计,全世界超过 2 亿人受外周动脉疾病(peripheral arterial disease, PAD)的影响,在美国约 800 万人患有 PAD^[1]。PAD 是动脉粥样硬化导致的进展性慢性动脉闭塞性疾病^[2],需明确的是 PAD 通常意义上指除冠状动脉和主动脉以外的所有动脉疾病^[1]。为避免混淆,本综述此次仅回顾 PAD 中下肢动脉疾病的临床前模型构建方法,且本文中 PAD 特指下肢动脉疾病。

构建可靠、能模拟临床症状的 PAD 模型是做好转化医学的重要环节。下肢缺血作为 PAD 最重要的病理改变,是诱发众多临床症状的重要原因。因此,构建下肢缺血模型作为 PAD 临床前模型,可以为探索改善 PAD 患者下肢血流灌注的治疗方法提供良好的工具。研究者们已建立小鼠、大鼠、兔子和猪等动物的后肢缺血模型^[3-6]。考虑到临床相关性、成本、动物体积和可提供的组织材料量,鼠后肢缺血模型在以上几类动物模型中更占优势^[3,7]。由于小鼠有多种品系,因此比大鼠应用更为广泛。由于大鼠和小鼠是该模型中常用的啮齿类动物,因此本综述只介绍大鼠或小鼠的后肢缺血模型,综述中的鼠类特指大鼠和小鼠。1998 年 Couffignal 等^[8]首次使用 C57BL/6 小鼠构建的鼠后肢缺血模型,该模型是现阶段 PAD 最常用的临床前模型^[9-10],随后又有研究者将该造模方法运用到大鼠上^[11-13],该模型主要用于治疗性血管新生研究或动脉形成机制探索。迄今为止,文献记录的大鼠或小鼠后肢缺血模型的构建方法繁多,包括手术结扎^[8]、介入栓塞^[7]、

光化学栓塞^[14]、物理^[15-16]或化学损伤^[17]和 Ameroid 收缩器法^[18],以上方法都是基于减少甚至阻断目标后肢主要血流灌注来达到目的,因此造模后的评价也基于检测目标后肢血流灌注变化进行。不同方法在血流灌注恢复时间窗、副作用、循环细胞因子水平、周围组织损伤程度等多方面存在差异。这些差异会干扰实验对血管新生或动脉形成的结果,进而无法真实的反应实验药物疗效。除此之外,鼠的品系、性别、年龄、麻醉方法和手术方式也会对模型本身血管新生或动脉形成造成影响^[19-23]。

本综述旨在总结现有的鼠后肢缺血模型造模和评价方法,对常见造模方法的优缺点进行比较。同时分析可能对模型产生影响的因素,以供后续研究选择合适的造模方法或进行优化提供参考。

1 鼠后肢动静脉解剖概述

鼠腹主动脉分支出左右髂总动脉,髂总动脉向远端又依次分支出臀前动脉、臀后动脉、髂股动脉、髂外动脉和髂内动脉。其中髂外动脉是鼠后肢的主要供血动脉,髂外动脉经过腹股沟韧带后移形为股总动脉。股总动脉向远端依次分支出旋股外侧动脉和近侧股动脉,并最终分出隐动脉和腘动脉。臀前动脉和臀后动脉为股二头肌供血,髂股动脉和旋股外侧动脉为股四头肌供血。髂内动脉分支处股深动脉和近侧股动脉为后肢内收肌群供血。隐动脉及腘动脉向远端多次分支为足部供血^[24-26]。相应的静脉伴动脉同行(见图 1)。

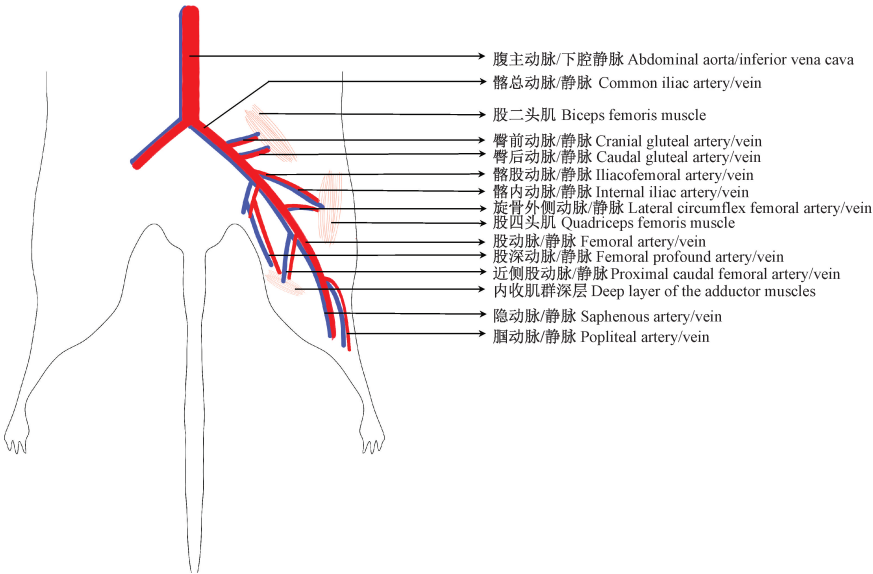


图 1 鼠后肢动静脉及其供血肌肉解剖示意图

Figure 1 Anatomy schematic diagram of murine hind limb arteries, veins and their blood-supplying muscles

2 现有造模方法

鼠 PAD 模型分为急性后肢缺血模型和亚急性后肢缺血模型。两种类型的后肢缺血模型采用了不同的造模方法。其中,鼠后肢急性缺血模型的造模方法众多,是研究 PAD 使用最广泛的鼠类模型^[18]。而相比之下鼠后肢亚急性缺血模型造模方法单一,仅有一种造模方法。

2.1 急性后肢缺血模型

鼠急性后肢缺血模型通常是通过快速闭塞后肢动脉构建。后肢动脉的闭塞常通过结扎、电凝、介入栓塞、光化学栓塞和物理或化学损伤等手段来完成。以上不同的急性后肢缺血模型造模方法之间有着很大不同,并且同一造模方法下也可能存在着数种不同的造模方式。

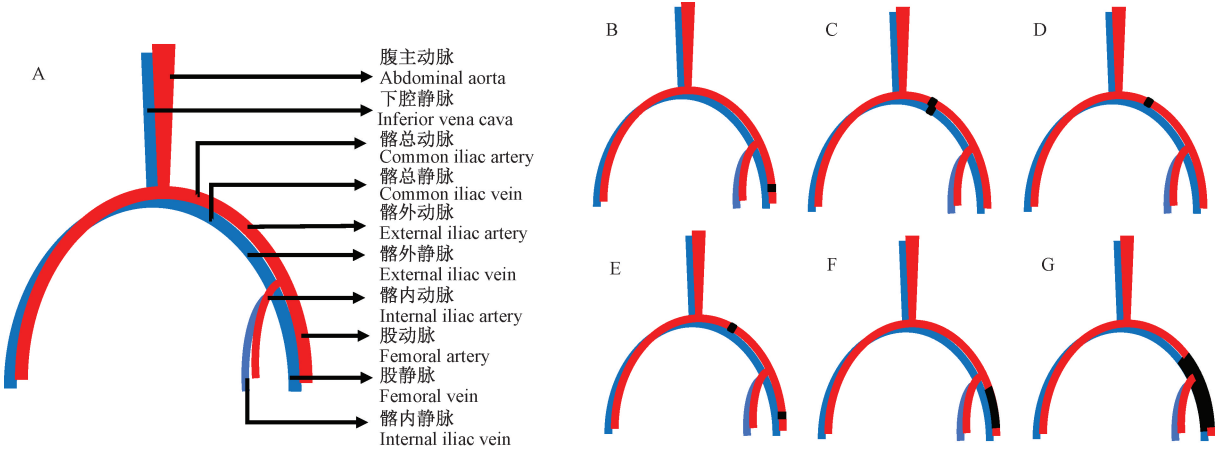
2.1.1 鼠后肢动脉结扎

鼠后肢动脉结扎是 PAD 研究中使用最广泛的造模方法。该方法通常从鼠一侧后肢内侧切口,暴露后肢动脉并于结扎后离断以达到后肢缺血。另一侧后肢作为对照用于造模评价中的对比而不进行手术操作。鼠后肢动脉结扎因结扎方式、结扎次数、结扎位置以及离断与否而存在着多种不同的造模方式,同时也因上述因素造成了鼠后肢缺血模型血流恢复和血管新生模式的差异。

根据结扎方式的不同可分为不可吸收尼龙线

结扎法和电凝闭塞法。而根据结扎次数可分为单次结扎和双重结扎,也就是指结扎后肢动脉中的一支或两支,如单次股动脉结扎和股动脉与髂总动脉双重结扎。双重结扎比单次结扎造成的后肢缺血更严重,恢复时间也会更长。当然,不同的结扎位置也导致鼠后肢缺血情况的差异。现有的手术方法通常侧重于髂动脉^[27]、股动脉及其分支的结扎^[8],其中部分手术方法对目标动脉周围静脉和神经进行了剥离^[28-30]。还有,对于双重结扎后是否离断两结扎部位间的血管,决定了模型的实验用途,如股动脉双重结扎离断术后的模型就不适用于评估动脉生成,但十分适合用于评估缺血性远端组织的血管生成。

根据结扎方式、结扎次数、结扎位置和离断与否对现有的鼠后肢动脉结扎模型进行分类,其方法主要包括单次股动脉电凝或结扎^[11,31-33]、单次髂总动静脉电凝或结扎^[30,34]、单次髂总动脉电凝或结扎^[11,31,35]、股动脉与髂总动脉双重电凝^[31,36]、股动脉双重电凝或结扎离断^[8,12,31,35]以及髂外动静脉和股动静脉双重结扎离断术^[23,37](见图 2)。这 6 种手术除了结扎方式、结扎次数、结扎位置以及离断与否不同外,手术操作手法基本相似,都是从腹部或腹股沟附近进行切开,暴露并游离出目标血管进行操作。该造模方法所使用的鼠类较为广泛,包括 C57BL/6 小鼠^[8,31,34]、C57BL/6 遗传背景的基因敲



注: A: 鼠后肢血管解剖简图; B: 单次股动脉电凝或结扎; C: 单次髂总动静脉电凝或结扎; D: 单次髂总动脉电凝或结扎; E: 股动脉与髂总动脉双重电凝; F: 股动脉双重电凝或结扎离断; G: 髂外动静脉和股动静脉双重结扎离断术; 黑色条状物表示血管的切割或剥离部位。

图 2 不同手术方法简图

Note. A. Brief schematic illustration of vascular anatomy in the murine hindlimb. B. Single electrocoagulation or ligation of femoral artery. C. Single electrocoagulation or ligation of common iliac artery and vein. D. Single electrocoagulation or ligation of the common iliac artery. E. Double electrocoagulation or ligation of common iliac and femoral artery. F. Double electrocoagulation or ligation of femoral artery with dissection. G. Double ligation and dissection of external iliac artery and vein and femoral artery and vein. The black bar indicates the cut or stripped sites of the vessels.

Figure 2 Schematic illustration of various surgical methods

除小鼠^[30-31,33,35]、BALB/c 小鼠^[38]、Lewis 大鼠^[12]和 Wistar 大鼠^[11,13]。根据不同的 PAD 类型,研究者还会在鼠动脉结扎前对其进行干预已达到接近临床疾病,如下肢动脉硬化闭塞症模型会使用高脂高能饲料喂饲载脂蛋白 E (apolipoprotein E, *ApoE*) 基因敲除小鼠后手术^[39],以及糖尿病性下肢缺血会先建立糖尿病鼠模型后再手术^[13]。

2.1.2 介入栓塞

介入操作也因其创伤较小,对实验动物整体及局部影响较弱而备受关注。在鼠后肢缺血模型中,已有不少研究使用介入栓塞的方法进行造模。其中大鼠因下肢动脉管腔较粗,容易行介入操作,颇受研究者的青睐,如 Lewis 大鼠^[7]和 SD 大鼠^[40]于既往文献中被用来造模。介入栓塞法是通过鼠颈动脉将导管送入,在造影引导下至髂动脉和尾部上腹部上动脉间,注射栓塞剂对局部血管进行栓塞以造成组织缺血。既往用作栓塞剂的有水凝胶线^[7]、聚乙烯醇颗粒^[40-41]和 N-丁基氰基丙烯酸酯^[40]。其中,水凝胶线是介入栓塞中使用最广泛的栓塞剂。

2.1.3 光化学栓塞

光化学栓塞是通过光化学反应诱导的后肢血栓形成,进而造成后肢缺血的一种新型造模方法。既往文献使用 ICR 小鼠^[14,42]和 Wistar 大鼠^[43],通过给鼠尾静脉注射光敏剂,再使用特定光源照射一段时间后诱导局部动脉血栓形成。常用的光敏剂有赤藓红 B 和孟加拉玫瑰红,注射上述光敏剂后分别使用冷白光或过滤绿光照射小鼠目标动脉 30 ~ 40 min 诱导血栓形成^[14,42-43]。光敏剂可损害血管内皮并在照明后的最初几分钟内诱导局部血小板聚集而形成血栓。该方法可以通过改变光束位置、强度和光敏剂浓度来控制血栓大小及位置^[44]。

2.1.4 化学损伤

Kurz 等^[17]首次使用 SD 大鼠验证了氯化铁直接作用于动脉表面会迅速诱导动脉内富含血小板的血栓形成。在氯化铁的刺激下通常会进展为完全性血栓闭塞,进而完成后肢缺血模型造模^[45]。一般在解剖显微镜下,在目标动脉上包裹一块浸泡过氯化铁(10% ~ 50%)的滤纸(约 1 ~ 2 mm)。滤纸包裹动脉时长约为 3 min,随后取下^[46]。此时动脉内血栓逐渐形成,最终导致血管完全闭塞。既往文献中也曾使用基因敲除小鼠进行造模,如 *P2Y12* 基因敲除小鼠^[46]和白细胞相关免疫球蛋白白样受体基因敲除小鼠^[47]。

2.1.5 物理损伤

现有的物理损伤法通常包括机械损伤和电损伤,二者都是通过物理手段对动脉血管壁造成损伤,继而诱发血小板黏附和附壁血栓形成。机械损伤使用柔性导丝在血管内部旋转而造成动脉内皮损伤,随即诱发附壁血栓形成^[15,48-49]。损伤的动脉中膜平滑肌细胞丢失和坏死在造模第 1 天同时发生。在随后的 14 d 内,血栓形成和血小板沉积从第 1 天的 100% 逐渐衰减到 25%。该模型通常使用蛋白酶受体-1 缺乏的转基因小鼠,用于研究细胞增殖和中膜增厚^[49];另一种物理损伤是由微电凝器产生穿透动脉血管壁的电对动脉血管壁造成损伤,随后诱导由血小板和纤维蛋白形成混合血栓^[16,50]。既往电损伤模型使用过 C57BL/6 小鼠^[16]和 *ApoE* 基因敲除小鼠^[50]。

2.2 亚急性后肢缺血模型

鼠后肢亚急性缺血模型使用 Ameroid 收缩器进行造模^[18,51]。Ameroid 收缩器由不锈钢外壳包裹,内层是酪蛋白的环状物。酪蛋白是一种吸湿性物质,吸收体液后会缓慢膨胀。不锈钢外层迫使酪蛋白向内膨胀,最终阻断目标动脉血流^[52]。在鼠后肢亚急性缺血模型中 Ameroid 收缩器通常于 1 ~ 10 d 内逐渐关闭^[53]。在暴露并剥离出目标血管后,选择合适尺寸的 Ameroid 收缩器固定在血管上即可完成造模。既往文献中使用了 C57BL/6 小鼠^[51,53]、BALB/c 小鼠^[54]或 C57BL/6 遗传背景的基因敲除小鼠^[53,55]。

3 鼠后肢缺血模型常见评价方法

鼠后肢缺血模型的造模评价通常基于观察目标肢体血流灌注的变化。对于急性后肢缺血模型的造模评价,通常在造模后立即对目标后肢进行血管检查或血流灌注检测,并与对侧后肢(未行造模操作侧)作对比。而亚急性后肢缺血模型往往在造模后的 2 周内进行多次检测来评价模型动物。常见的评价方法如下。

3.1 激光多普勒灌注成像

激光多普勒灌注成像是基于激光和红细胞之间的相互作用引起的多普勒频移被记录并转换为电信号上进行分析的结果^[56]。该技术能够用于监测人体或动物组织血流灌注的情况。激光多普勒灌注成像作为一种非侵入性的组织血流灌注检测方法,在同种实验条件下具有较高的一致性和可重

复性,是使用最为广泛的评价鼠下肢缺血模型的方法^[22,26,56-57]。

3.2 微型计算机断层扫描

微型计算机断层扫描是一种 3D X 射线成像技术,该技术与临床常见的 CT 扫描方式相同,有着扫描尺度小、分辨率高、重复性高的特点,对于微小而精细的结构能够实现体内高分辨率成像^[58-59]。

3.3 核磁共振成像

核磁共振成像同样也能评价鼠后肢缺血模型的造模效果,其中最常用的就是对比增强核磁共振血管成像 (contrast enhanced magnetic resonance angiography, CE-MRA) 和时间飞跃法 (time of flight, TOF)^[40,60]。其中,CE-MRA 是需要注射钆造影剂后实现核磁共振血管成像,而 TOF 则不需要额外注射造影剂即可完成血管成像。

3.4 单光子发射计算机断层成像术

Hendrikx 等^[61]发现基于放射性同位素示踪剂的单光子发射计算机断层成像术 (Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT) 能够用于鼠后肢的血流灌注检测。SPECT 是无创、高分辨率、高重复性的检测方法,但该检测方法对设备条件要求较高且操作难度较大使其不能被广泛使用。

3.5 其他

除了上述的 4 种评价方法,还有新兴的对比增强超声技术^[62]、空间频域成像技术^[63]以及吖啶菁绿标记的荧光实时显影技术^[38,64]等技术也用于鼠后肢缺血模型造模评价中,且效果良好。

4 各种造模方法的优劣对比

鼠后肢动脉结扎作为使用最广泛的鼠后肢缺血模型有着众多不可忽视的优点。该方法适用于实验室条件要求不高、操作简单的科研环境,并可参考已发表的论文以获取详细的操作流程或完整的操作视频。同时,此法易于找到目标动脉(尤其是股动脉),死亡率低^[65]。这对于初次接触或尚不熟悉动物实验的研究人员来说十分友好。但该方法因有创导致的局部炎症、手术过程中的神经刺激及静脉创伤而被诟病。有研究发现,手术导致的局部炎症会影响血管新生相关细胞因子的水平^[7]。同时,在手术操作的过程中分离股神经、动脉和静脉时,要避免损伤到股神经和静脉。由于神经是血管内皮生长因子的主要来源^[66],在血管新生的过程中发挥着重要作用,手术时对神经的破坏也会影响

血管新生和动脉生成^[67]。而股静脉受到损伤后,有可能造成致命性的出血,虽然部分小静脉的出血可以通过压迫法进行止血,但大静脉的撕裂往往更难止血且常造成不良结果。不过,部分研究者建议同时结扎动静脉,以避免造成静脉损伤并提高可重复性^[32,37]。

而介入栓塞法和光化学栓塞法在根本上摆脱了鼠后肢动脉结扎法中出现的局部炎症、神经损伤和静脉损伤的干扰,保持了组织的完整性,降低了炎症反应及感染的风险。然而,这两种方法对实验室条件、实验人员技术和资金都有更高的要求。介入栓塞要求实验人员要熟悉鼠的循环系统解剖,并且在造模的过程中还要承担辐射的风险。介入栓塞学习难度高,造模时间相对较长,难以多人同时开展造模,该方法对需要大批量造模的实验来说并非最佳选择。光化学栓塞作为无创的血管闭合造模方法,具有高度的重现性^[14]。相比于动脉结扎模型,光化学诱导模型血流恢复相对较慢,提供了更长的治疗时间窗和更稳定的缺血模型。而动脉结扎法快速灌注恢复,让血管新生因额外治疗还自身改善这个问题变得模糊不清。有研究观察到,光化学栓塞诱导的鼠后肢缺血模型中,鼠的症状表现随着时间推移而逐渐出现组织变色、坏疽和截肢,与临床病例的病程演变过程有着较高的契合性^[14]。同时,注射到鼠体内的光敏剂不会对器官功能产生影响,鼠存活率高。但该方法实验因没有对光源照射的强度和大小作出统一的要求,后续仍需进一步造模优化。

化学损伤法通过氯化铁溶液诱导动脉内血栓形成,从而避免了离断或结扎等手术方法造成的额外血管和周围组织损伤。同时,该造模过程不需要使用特殊设备诱导血栓形成。该方法诱导的血栓由血小板富集而成,在解剖显微镜下和人类动脉血栓十分相似^[45]。

物理损伤法中的机械损伤法在理论上可用于下肢动脉缺血的造模,但既往研究大多将其应用于内皮剥脱和中膜损伤血管中的研究^[68]。对于机械损伤法诱导的下肢动脉缺血的运用,有待于进一步评价并制定相关的标准化操作流程,以提高造模的一致性。而电损伤法最初用于观察血管新内膜形成的动物模型。随后再狭窄研究中的血管中膜增厚也常通过该方法进行造模^[16]。由于对初始血凝块形成进行标准化可能性较低,并且整个血管壁存

在大量坏死,因此该模型不太适合用作新药疗效评估的血栓形成^[3]。

Ameroid 收缩器法作为亚急性后肢缺血模型虽然是慢性下肢缺血的不完美模型,但也填补了非急性后肢缺血模型的空白。该法也存在着一些不足:首先,Ameroid 收缩器比介入栓塞法造模花费少,但相较于传统动脉结扎法更昂贵;其次,Ameroid 收缩器如果插槽太浅,动脉可能会在收缩期间挤出,导致造模失败;而酪蛋白在收缩器内分布不均匀会导致闭塞率加快而失去慢性闭塞的意义^[9];最后,该方法诱导的后肢反应与急性后肢缺血模型不同,逐渐闭塞的动脉与相应的侧枝代偿使得难以观察到远端肢体的缺血和血管新生,并且相较于急性后肢缺血模型,该模型后肢中剪切应力反应基因和炎症基因缺乏上调^[69]。由此可见,该模型仍需更多的研究来进行优化和改进。

5 造模中的影响因素

对于后肢缺血模型造模方法导致的差异需要重视外,造模中其他因素的影响也不可轻易被忽略,否则会造成实验结果的偏差。首先,不同品系的鼠拥有完全不同的血流灌注恢复模式。Helisch 等^[20]观察了 C57BL/6、BALB/c 和 129S2/Sv 三种品系的小鼠在双重股动脉结扎术后当天、第 7、14、21 和 28 天时血流灌注,侧枝的形成以及运动耐力的情况。结果表明原有的侧枝血管系统遗传差异会影响股动脉闭塞后代偿性侧枝动脉生长的结果和组织环境^[20]。其次,鼠的性别也会对模型本身造成影响。有研究发现 C57BL/6J 的雌性小鼠在动脉结扎手术后 7 d 血流灌注恢复比雄性小鼠低,这可能由雌性小鼠后肢侧枝重构减少、血管生成减少、血管舒张反应受损和血管收缩活性增加所致^[21]。并且,鼠的年龄会影响缺血恢复的速度。幼年(6 ~ 8 周龄)鼠比老年(8 ~ 10 月龄)鼠血流灌注恢复更快、更完整。对于促血管新生的研究,老年鼠是最佳选择,因为可能在治疗干预后观察到不同组之间更为显著的差异。而对于抗血管新生的研究,应优先选择幼年鼠来更好的呈现实验结果^[23]。鼠的麻醉方法也会影响造模。有研究表明 α -激动剂可能诱导早期外周血管收缩从而对实验结果造成干扰^[19]。氯胺酮和 α -激动剂的联合使用不适用于富含血管平滑肌细胞血管系统的研究^[22]。

6 总结及展望

总的来说,现有的鼠后肢缺血模型的造模方式较为多样,可供不同实验室条件及不同需求的研究者进行选择。而实验动物的选择,应根据实验需求选择使用合适类型的大鼠或小鼠,若使用不同于既往文献的大鼠或小鼠类型,可通过预实验探索可行性。但应注意如何选择与自身研究方向更为契合的造模方法才是最重要的。同时,现有的鼠后肢缺血造模方式仍不完美,对于后肢慢性缺血模型的构建仍在探索。当下的造模方式无法很好的复刻临床 PAD 患者的病理基础和病程进展。并且,现有的方法缺乏统一的标准,部分造模方法仍需要进一步的优化。

参 考 文 献(References)

- [1] Criqui MH, Matsushita K, Aboyans V, et al. Lower extremity peripheral artery disease: contemporary epidemiology, management gaps, and future directions: a scientific statement from the American heart association [J]. *Circulation*, 2021, 144 (9): e171-e191.
- [2] Feller D, Giudice A, Faletra A, et al. Identifying peripheral arterial diseases or flow limitations of the lower limb: important aspects for cardiovascular screening for referral in physiotherapy [J]. *Musculoskelet Sci Pract*, 2022, 61: 102611.
- [3] Ebert MLA, Schmidt VF, Pfaff L, et al. Animal models of neointimal hyperplasia and restenosis: species-specific differences and implications for translational research [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2021, 6(11): 900-917.
- [4] Samatoshenkov I, Krasivskyi I, Djordjevic I, et al. New experimental model of hind limb ischemia in pot-bellied pigs [J]. *Microvasc Res*, 2023, 145: 104425.
- [5] Ifergan G, Autret G, Del Giudice C, et al. Dynamic contrast enhanced-MRI efficiency in detecting embolization-induced perfusion defects in a rabbit model of critical-limb-ischemia [J]. *Magn Reson Imaging*, 2022, 87: 88-96.
- [6] El-Waseif AG, Nader MA, Salem HA, et al. Fasudil, a ROCK inhibitor, preserves limb integrity in a mouse model of unilateral critical limb ischemia: Possible interplay of inflammatory and angiogenic signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2022, 309: 121019.
- [7] Zhuang ZW, Shi J, Rhodes JM, et al. Challenging the surgical rodent hindlimb ischemia model with the miniinterventional technique [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2011, 22(10): 1437-1446.
- [8] Couffignal T, Silver M, Zheng LP, et al. Mouse model of angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(6): 1667-1679.
- [9] Padgett ME, McCord TJ, McClung JM, et al. Methods for acute and subacute murine hindlimb ischemia [J]. *J Vis Exp*, 2016

- (112): 54166.
- [10] Shimatani K, Sato H, Saito A, et al. A novel model of chronic limb ischemia to therapeutically evaluate the angiogenic effects of drug candidates [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2021, 320(3): H1124-H1135.
 - [11] 梁翠宏, 田铎, 徐蕴, 等. 结扎切断法制作大鼠后肢缺血模型的效果 [J]. *解剖学杂志*, 2006, 29(6): 795-797.
Liang CH, Tian H, Xu Y, et al. Effect of ligation and amputation on rat hind limb ischemia model [J]. *Chin J Anat*, 2006, 29(6): 795-797.
 - [12] 杨盛家, 陈兵, 罗涛, 等. 大鼠后肢急性缺血模型的构建及评估 [J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(6): 580-583.
Yang SJ, Chen B, Luo T, et al. Construction and evaluation of rat hindlimb acute ischemia model [J]. *Chin J Gen Surg*, 2009, 18(6): 580-583.
 - [13] 齐一侠, 张超, 崔世军, 等. 糖尿病后肢缺血大鼠模型的建立与评估 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 586-590.
Qi YX, Zhang C, Cui SJ, et al. Establishment and evaluation of a diabetic rat model of hindlimb ischemia [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(6): 586-590.
 - [14] Han SS, Jin Z, Lee BS, et al. Reproducible hindlimb ischemia model based on photochemically induced thrombosis to evaluate angiogenic effects [J]. *Microvasc Res*, 2019, 126: 103912.
 - [15] Takayama T, Shi X, Wang B, et al. A murine model of arterial restenosis: technical aspects of femoral wire injury [J]. *J Vis Exp*, 2015(97): 52561.
 - [16] Chaudhuri P, Smith AH, Graham LM, et al. Inhibition of P110 α and P110 δ catalytic subunits of PI₃ kinase reverses impaired arterial healing after injury in hypercholesterolemic male mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(6): C943-C955.
 - [17] Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride [J]. *Thromb Res*, 1990, 60(4): 269-280.
 - [18] Krishna SM, Omer SM, Li J, et al. Development of a two-stage limb ischemia model to better simulate human peripheral artery disease [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3449.
 - [19] Medgett IC, Ruffolo RR Jr. Alpha adrenoceptor-mediated vasoconstriction in rat hindlimb: innervated alpha-2 adrenoceptors in the saphenous arterial bed [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988, 246(1): 249-254.
 - [20] Helisch A, Wagner S, Khan N, et al. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(3): 520-526.
 - [21] Peng X, Wang J, Lassance-Soares RM, et al. Gender differences affect blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(6): H2027-H2034.
 - [22] Greco A, Ragucci M, Liuzzi R, et al. Repeatability, reproducibility and standardisation of a laser Doppler imaging technique for the evaluation of normal mouse hindlimb perfusion [J]. *Sensors*, 2012, 13(1): 500-515.
 - [23] Ministro A, de Oliveira P, Nunes RJ, et al. Assessing therapeutic angiogenesis in a murine model of hindlimb ischemia [J]. *J Vis Exp*, 2019, 148: 1.
 - [24] Kochi T, Imai Y, Takeda A, et al. Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84047.
 - [25] Wang AN, Fraser GM, McGuire JJ. Characterization of endothelium-dependent relaxation in the saphenous artery and its caudal branches in young and old adult sprague dawley rats [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 889.
 - [26] Babaei S, Dai B, Abbey CK, et al. Monitoring muscle perfusion in rodents during short-term ischemia using power Doppler ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2023, 49(6): 1465-1475.
 - [27] van Weel V, Toes RE, Seghers L, et al. Natural killer cells and CD4⁺ T-cells modulate collateral artery development [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2310-2318.
 - [28] Kwee BJ, Seo BR, Najibi AJ, et al. Treating ischemia via recruitment of antigen-specific T cells [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7): eaav6313.
 - [29] Terry T, Chen Z, Dixon RA, et al. CD34⁺/M-cadherin⁺ bone marrow progenitor cells promote arteriogenesis in ischemic hindlimbs of ApoE^{-/-} mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20673.
 - [30] Meda Venkata SP, Li H, Xu L, et al. Inhibition of GPR39 restores defects in endothelial cell-mediated neovascularization under the duress of chronic hyperglycemia: evidence for regulatory roles of the sonic hedgehog signaling axis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(1): e2208541120.
 - [31] Hellingman AA, Bastiaansen AJ, de Vries MR, et al. Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010, 40(6): 796-803.
 - [32] Limbourg A, Korff T, Napp LC, et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(12): 1737-1746.
 - [33] Bastiaansen AJ, Ewing MM, de Boer HC, et al. Lysine acetyltransferase PCAF is a key regulator of arteriogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8): 1902-1910.
 - [34] Bai T, Li M, Liu Y, et al. The promotion action of AURKA on post-ischemic angiogenesis in diabetes-related limb ischemia [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 39.
 - [35] Hellingman AA, Zwaginga JJ, van Beem RT, et al. T-cell-pre-stimulated monocytes promote neovascularisation in a murine hind limb ischaemia model [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2011, 41(3): 418-428.
 - [36] Hellingman AA, van der Vlugt LE, Lijkwan MA, et al. A limited role for regulatory T cells in post-ischemic neovascularization [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(2): 328-336.
 - [37] Westvik TS, Fitzgerald TN, Muto A, et al. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis [J]. *J Vasc Surg*, 2009, 49(2): 464-473.

- [38] Jeong IH, Bae WY, Choi JS, et al. Ischemia induces autophagy of endothelial cells and stimulates angiogenic effects in a hindlimb ischemia mouse model [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 624.
- [39] Pellegrin M, Bouzouren K, Mazzolai L. Exercise prior to lower extremity peripheral artery disease improves endurance capacity and hindlimb blood flow by inhibiting muscle inflammation [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 706491.
- [40] Shin CI, Kim HC, Song YS, et al. Rat model of hindlimb ischemia induced via embolization with polyvinyl alcohol and N-butyl cyanoacrylate [J]. *Korean J Radiol*, 2013, 14(6): 923–930.
- [41] Wang T, Su H, Gu J, et al. Evaluation of skeletal muscle perfusion in a canine hind limb ischemia model using CT perfusion imaging [J]. *Diagn Interv Radiol*, 2020, 26(1): 28–33.
- [42] Kikuchi S, Umemura K, Kondo K, et al. Photochemically induced endothelial injury in the mouse as a screening model for inhibitors of vascular intimal thickening [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(7): 1069–1078.
- [43] Matsuno H, Uematsu T, Nagashima S, et al. Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model [J]. *J Pharmacol Methods*, 1991, 25(4): 303–317.
- [44] Li H, Roy Choudhury G, Zhang N, et al. Photothrombosis-induced focal ischemia as a model of spinal cord injury in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015, 101: e53161.
- [45] Grover SP, Mackman N. How useful are ferric chloride models of arterial thrombosis? [J]. *Platelets*, 2020, 31(4): 432–438.
- [46] Ohno K, Tomizawa A, Mizuno M, et al. Prasugrel, a platelet P2Y₁₂ receptor antagonist, improves abnormal gait in a novel murine model of thrombotic hindlimb ischemia [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(4): e002889.
- [47] Smith CW, Thomas SG, Raslan Z, et al. Mice lacking the inhibitory collagen receptor LAIR-1 exhibit a mild thrombocytosis and hyperactive platelets [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(5): 823–835.
- [48] Cheung WM, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, et al. Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(12): 3014–3024.
- [49] Pamulapati V, Cuda CM, Smith TL, et al. Inflammatory cell dynamics after murine femoral artery wire injury: a multi-parameter flow cytometry-based analysis [J]. *Cells*, 2023, 12(5): 689.
- [50] Jensen DM, Skovsted GF, Bonde MFB, et al. Semaglutide treatment attenuates vessel remodelling in ApoE^{-/-} mice following vascular injury and blood flow perturbation [J]. *Atheroscler Plus*, 2022, 49: 32–41.
- [51] Kesler A, Lindemer B, Broeckel G, et al. *In vivo* characterization of a red light-activated vasodilation: a photobiomodulation study [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 880158.
- [52] Kitase Y, Sato Y, Arai S, et al. Establishment of a novel fetal growth restriction model and development of a stem-cell therapy using umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 212.
- [53] Silva AT, Rouf F, Semola OA, et al. Placental growth factor levels in quadriceps muscle are reduced by a Western diet in association with advanced glycation end products [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 317(4): H851–H866.
- [54] McClung JM, McCord TJ, Southerland K, et al. Subacute limb ischemia induces skeletal muscle injury in genetically susceptible mice independent of vascular density [J]. *J Vasc Surg*, 2016, 64(4): 1101–1111.
- [55] Cheng HS, Zhuang R, Pérez-Cremades D, et al. A miRNA/CXCR4 signaling axis impairs monopoiesis and angiogenesis in diabetic critical limb ischemia [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(7): e163360.
- [56] Tang GL, Kim KJ. Laser Doppler perfusion imaging in the mouse hindlimb [J]. *J Vis Exp*, 2021, 170: 10.
- [57] Xu H, Lu S, Ding L, et al. Pulsatility index as a novel parameter for perfusion in mouse model of hindlimb ischemia [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(5): 2114–2122.
- [58] Risser GE, Machour M, Hernaiz-Estrada B, et al. Effects of Interleukin-4 (IL-4)-releasing microparticles and adoptive transfer of macrophages on immunomodulation and angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2023, 296: 122095.
- [59] Suh JW, Scheinost D, Dione DP, et al. A non-rigid registration method for serial lower extremity hybrid SPECT/CT imaging [J]. *Med Image Anal*, 2011, 15(1): 96–111.
- [60] Goggi JL, Haslop A, Boominathan R, et al. Imaging the proangiogenic effects of cardiovascular drugs in a diabetic model of limb ischemia [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2019, 2019: 2538909.
- [61] Hendrikx G, Vries MH, Bauwens M, et al. Comparison of LDPI to SPECT perfusion imaging using (99m) Tc-sestamibi and (99m)Tc-pyrophosphate in a murine ischemic hind limb model of neovascularization [J]. *EJNMMI Res*, 2016, 6(1): 44.
- [62] Becker AB, Chen L, Ning B, et al. Contrast-enhanced ultrasound reveals partial perfusion recovery after hindlimb ischemia as opposed to full recovery by laser Doppler perfusion imaging [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2022, 48(6): 1058–1069.
- [63] Leyba KA, Vasudevan S, O'Sullivan TD, et al. Evaluation of hemodynamics in a murine hindlimb ischemia model using spatial frequency domain imaging [J]. *Lasers Surg Med*, 2021, 53(4): 557–566.
- [64] Guang H, Cai C, Zuo S, et al. Multiparametric evaluation of hindlimb ischemia using time-series indocyanine green fluorescence imaging [J]. *J Biophotonics*, 2017, 10(3): 456–464.
- [65] Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, et al. Murine model of hindlimb ischemia [J]. *JoVE*, 2009, 23: 1035.
- [66] Mukouyama YS, Shin D, Britsch S, et al. Sensory nerves

determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin [J]. Cell, 2002, 109(6): 693-705.

[67] Cen Y, Liu J, Qin Y, et al. Denervation in femoral artery-ligated hindlimbs diminishes ischemic recovery primarily via impaired arteriogenesis [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154941.

[68] Wu Y, Su SA, Xie Y, et al. Murine models of vascular endothelial injury: techniques and pathophysiology [J]. Thromb Res, 2018, 169: 64-72.

[69] Yang Y, Tang G, Yan J, et al. Cellular and molecular mechanism regulating blood flow recovery in acute versus gradual femoral artery occlusion are distinct in the mouse [J]. J Vasc Surg, 2008, 48(6): 1546-1558.

[收稿日期] 2023-04-19

抗凋亡蛋白 BCL-XL 作为胃癌治疗靶点的可行性研究

我国是胃癌的高发大国,其中进展期胃癌具有治疗效果差、治疗方案少且复发率高的特点。因此寻找新的治疗靶点有助于改善进展期胃癌患者的预后。凋亡逃逸是肿瘤细胞的主要标志之一,通过靶向促存活 BCL2 家族蛋白直接诱导细胞凋亡是一种很有前途的癌症治疗策略。因此,了解支持癌细胞存活的分子机制可以为潜在的靶向治疗提供分子基础。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所肿瘤课题组的研究人员首先报道了 BCL2L1 基因和其编码的促存活蛋白 BCL-XL 在胃癌中的作用以及 BCL-XL 靶向药物作用于胃癌的可行性。结果显示,部分胃癌细胞系的存活依赖于 BCL-XL 且 BCL-XL 抑制剂 A1155463、A1331852 药物活性显著高 ABT-263,说明 ABT-263 不是 BCL-XL 的最佳抑制剂;基于 VHL 的 PROTAC-BCL-XL DT2216 在胃癌细胞中具有药物活性且 DT2216 通过蛋白酶体途径以时间和剂量依赖的方式降解 BCL-XL 诱导胃癌细胞凋亡;BCL-XL 蛋白水平可以有效预测胃癌细胞对 BCL-XL 抑制剂的药物敏感性;BCL2L1 基因拷贝数变异不能可靠地预测 BCL-XL 的表达。

综上,该研究发现 BCL-XL 有可能是胃癌治疗的潜在靶点,尤其是在 BCL-XL 高表达的胃癌亚群中。同时该研究发现选择性 BCL-XL 抑制剂和基于 VHL 的 PROTAC BCL-XL 都能有效地杀死依赖于 BCL-XL 的胃癌细胞。此外,该研究发现 BCL2L1 拷贝数变异(CNV)不能可靠地预测 BCL-XL 的表达,但是 BCL-XL 蛋白水平可以作为预测胃癌细胞对 BCL-XL 抑制剂敏感性的有效的生物标志物。综上所述,该研究证明了 BCL-XL 是特定胃癌亚群的潜在药物靶点。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(Animal Models and Experimental Medicine, 2023, 6(3):245-254, <http://doi.org/10.1002/ame2.12330>)。